

基于代谢组学和网络分析探讨胆汁酸在高血压进展中的潜在作用机制

齐于辰¹, 邹琳蓁¹, 韩学艳¹, 蒋海强¹, 李运伦^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

[摘要] **目的:**探讨胆汁酸及其代谢物在高血压前期的潜在作用机制,探索高血压前期的关键代谢途径和重要内源性靶点。**方法:**采用非靶向代谢组学和网络分析相结合的方法探讨高血压前期的代谢机制,用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱联用技术对高血压前期患者进行血清代谢组学分析,通过网络分析预测并生成相关的生物功能和信号目标,最终通过体外实验验证该重要途径的预测靶点,用酶联免疫吸附测定法(ELISA)和蛋白免疫印迹法(Western blot)实验分析并验证相关靶点信息。**结果:**采用非靶向代谢组学方法,发现在正常组、高血压前期组和高血压组中有64个潜在的生物标志物及13条代谢途径;网络分析和生物学验证结果表明,高血压前期的发生与胆汁酸和芳香族氨基酸代谢异常引起的血管炎症有关;胆汁酸代谢通过调节血管炎症反应在高血压前期的发生发展中起重要作用;氨基酸N-酰基转移酶、髓过氧化物酶及胆汁酸受体TGR5在代谢网络的变化中具有重要意义。**结论:**在高血压前期,胆汁酸可能参与调节血管炎症,从而导致高血压前期血管损伤。

[关键词] 高血压前期; 胆汁酸; 血管炎症; 代谢组学; 网络分析

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0178-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220311

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211229.1328.001.html>

[网络出版日期] 2021-12-30 8:49

Underlying Mechanisms of Bile Acids in Progression of Hypertension Based on Metabolomics and Network Analysis

QI Yu-chen¹, ZOU Lin-zhen¹, HAN Xue-yan¹, JIANG Hai-qiang¹, LI Yun-lun^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250355, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the underlying mechanism of bile acids and metabolites as well as the key metabolic pathways and important endogenous targets in prehypertension. **Method:** The metabolic mechanism of prehypertension was explored with non-targeted metabolomics combined with network analysis. The serum metabolomics of patients with prehypertension was analyzed by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. The relevant biological functions and signal targets were predicted and generated by network analysis. Finally, the predicted targets of this important pathway were verified by *in vitro* experiments, and the relevant information was verified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot. **Result:** As revealed by non-targeted metabolomics, there were 64 potential biomarkers and 13 metabolic pathways in the normal group, the prehypertension group, and the

[收稿日期] 20210820(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774242,81974555);山东省心血管病中医精准治疗工程实验室建设项目;济南“高校20条”资助项目(2020GXRC017)

[第一作者] 齐于辰,在读博士,从事中医药治疗神经系统疾病的研究,E-mail:qiyuchenbzy@163.com

[通信作者] *李运伦,博士,教授,博士生导师,从事中医药治疗心血管病的研究,E-mail:li.yunlun@163.com

hypertension group. The results of network analysis and biological verification showed that the occurrence of prehypertension was related to vascular inflammation caused by the abnormal metabolism of bile acids and aromatic amino acids. Bile acid metabolism plays an important role in the occurrence and development of prehypertension by regulating the vascular inflammatory response. Amino acid *N*-acyltransferase, myeloperoxidase, and bile acid downstream receptor TGR5 are critical in the changes of the metabolic network. **Conclusion:** In prehypertension, bile acids are presumedly involved in regulating vascular inflammation, resulting in damage to blood vessels in prehypertension.

[Keywords] prehypertension; bile acid; vascular inflammation; metabolomics; network analysis

原发性高血压由于引起心脏、大脑、肾脏和周围血管等靶器官损害,增加了心血管疾病的危险性,已成为人类疾病的主要病因之一。研究发现,中国成年人高血压患病率约达40%^[1],因此高血压的早发现、早治疗显得尤为重要。高血压前期[收缩压120~139 mmHg(1 mmHg≈0.133 kPa)或舒张压80~89 mmHg]于2003年首次提出^[2],全球患病率达25%~50%^[3],不仅是高血压和心血管疾病的高危因素^[3-4]而且还存在动脉亚临床功能障碍^[5],但症状表现不可察觉。大约90%的高血压前期患者有其他心血管危险因素^[6]。因此,预防和治疗高血压前期对公众来说是一个迫切的医学和社会问题。

高血压病的发生进展与体内的代谢过程密切相关,代谢是机体生命活动的根本,代谢物是机体功能变化的终点反应,内源性代谢物的变化往往能够反应机体功能和疾病的本质变化,而代谢组学可以全面地从生物代谢的角度揭示机体生命活动的本质,关注代谢层面所有的产物变化,并通过分析动态的代谢变化以阐述生物体的系统生化谱及功能调控规律。目前,健康人群和原发性高血压患者之间的差异性血清代谢标志物已通过核磁共振光谱检测,但是高血压前期状态的特异性生物标志物、脂质标志物还未被研究。

高血压的潜在生理和代谢驱动因素仍有待充分阐明,但高血压患者所表现出代谢物的变化,可通过代谢组学利用代谢谱来监测这些异常,并发现高血压不同时期的差异。本课题组前期研究中,利用液相色谱-质谱法(LC-MS)代谢组学平台和多元统计分析,在自发性高血压大鼠模型中发现与节律变化相关的生物标志物和途径,结果强调了时间和代谢物之间的联系^[7];发现黄连可以通过逆转10种潜在生物标志物的水平,调节磷脂、脂肪酸、氨基酸和花生四烯酸的代谢来降低高血压^[8];发现组织蛋白酶G,转化生长因子 β_1 ,透明质酸酶-1和激肽原-1 4种蛋白质能更好地预测原发性高血压的发生,阐

明高血压的病理生理机制^[9]。在此基础上,笔者继续进行高血压前期的代谢机制的研究。

1 材料

1.1 仪器及试剂 Ultimate 3000型超高液相色谱系统-Q-Exactive型质谱联用仪(美国赛默飞世尔科技公司);Centrifuge 5810R型高速台式离心机(Eppendorf);PL-203型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];MX-F型涡旋混合器(Servicebio);Rt2100c型酶标检测仪(Rayto);Neofuge 13R型冷冻离心机(Heal Force);AJC-0501-P型纯水仪(重庆艾科浦);D1008E型掌上离心机, MX-F型涡旋混合器,MS-PB型磁力搅拌器,TSY-B型脱色摇床(Servicebio);DYCZ-24DN型双垂直电泳仪,DYCZ-40D型转印电泳仪(北京六一仪器厂)。

甲醇(HPLC级,Merck);乙腈、甲酸(色谱纯,Fisher);蒸馏水(中国屈臣氏有限公司);6-羟基多巴胺(6-OHDA)酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)试剂盒(伊莱瑞特,批号VJRFRU8H);人白细胞介素(IL)-6,IL-10 ELISA试剂盒(上海博蕴生物科技有限公司,批号分别为30625H,30150H);电泳缓冲液,转移缓冲液,TBS缓冲液,5%脱脂乳,ECL溶液,BCA蛋白检测试剂盒,5×蛋白上样缓冲液, β -肌动蛋白(β -actin),RIPA裂解缓冲液,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,HRP标记的驴抗山羊IgG,HRP标记的山羊抗小鼠IgG,HRP标记的山羊抗大鼠IgG(Servicebio,批号分别为G2018,G2017,G0001,G5002,G2014,G2026,G2013,GB12001,G2002,G2003,GB23303,GB23404,GB23301,GB23302);聚偏氟乙烯(PVDF)膜0.45,0.22 μ m(Millipore,批号分别为IPVH00010,ISEQ00010)。

1.2 受试者来源 本研究方案经山东中医药大学伦理委员会批准[伦理批号(2016)伦审第(033)号-KY],所有被招募的参与者在采集血清样本前均签

署知情同意书。本课题来源于在2017年6月至2017年10月期间于山东中医药大学附属医院心病科门诊及病房、莱芜市中医院门诊的病人;健康志愿者均来自于山东中医药大学附属医院的查体中心。

从安全性角度出发,按照国家市场监督管理总局规定,本课题的中样本量估算均在保证单侧显著性水平为5%,检验功效为90%的情况下进行,计算公式为 $N=Z^2 \times (P \times (1-P)) / E^2$ 。本研究中所有患者均按2010年《高血压防治指南》诊断标准,共招募52例高血压前期患者(120 mmHg \leq 收缩压 \leq 139 mmHg或80 mmHg \leq 舒张压 \leq 89 mmHg),52名高血压患者(140 mmHg \leq 收缩压 \leq 179 mmHg或90 mmHg \leq 舒张压 \leq 109 mmHg),健康志愿者47名。曾经服用药物控制血压的患者必须经过2周的“洗脱期”。

排除标准:①高血压前期范围以外者;②孕妇和哺乳期妇女;③继发性高血压患者;④在精神上或法律定义的残疾者;⑤排除心、脑、肾等严重并发症或肿瘤、血液病、中风、艾滋病等急慢性病患者。

收集了所有入组人员的一般信息,包括性别、年龄、血压、体质指数(BMI)和职业、住址、身份证号码、婚姻状况、联系方式等,其中部分信息,见表1。通过克鲁斯卡尔-沃利斯单因素ANOVA检验将3个组别部分基线数据进行多重比较,经Kruskal-Wallis检验,3个组别年龄、性别和BMI差异均无统计学意义。收缩压、舒张压及平均动脉压差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 不同组别患者的临床参数

Table 1 Clinical parameters of recruited participants

参数	正常	高血压前期	高血压	P
年龄/岁	49.66 \pm 8.60	51.52 \pm 9.56	50.27 \pm 10.51	0.817
性别(男/女)	27/20	30/22	28/24	0.974
BMI	23.14 \pm 2.33	23.93 \pm 3.27	24.24 \pm 2.69	0.986
收缩压/mmHg	110.47 \pm 6.86	131.29 \pm 5.51	154.85 \pm 6.97	0.000
舒张压/mmHg	68.06 \pm 4.67	81.31 \pm 4.25	97.50 \pm 4.99	0.000
平均动脉压/mmHg	82.20 \pm 3.80	97.97 \pm 3.18	116.62 \pm 4.50	0.000

2 方法

2.1 血清样品的采集和制备 样品采集:用一次性采血针抽取患者清晨(7:00—8:00)空腹静脉血6 mL于促凝(含分离胶)采血管中,并轻轻摇匀。将血样静置约0.5 h。

样品处理与保存:在4 h内,血清部分可以较好的分层于分离胶上面,取上部透亮血清置于1.5 mL

规格的离心管中,再采用1万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 的高速离心机离心5 min(离心半径16 cm),仍旧吸取上部透亮血清用作血清制品,离心管封口放置于 -80°C 冰箱中冻存备用。

样品前处理:将血清样本从置于 -80°C 超低温冰箱中取出,于 4°C 冰箱下解冻,摇匀后用微量移液枪精密吸取血清100 μL ,加入内标(0.05% L-2-氯苯丙氨酸乙腈溶液)20 μL ,加入乙腈200 μL 进行沉淀,涡旋2 min以充分混匀,置于 4°C 冰箱静置6 h。用离心机在12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 速度下高速离心15 min,取上清液用氮吹仪吹干,加入初始流动相(2%的乙腈水溶液)200 μL 复溶,充分摇匀后用一次性注射器(1 mL)吸取上清液,过微孔滤膜(0.22 μm)进行过滤,导入液相小瓶中,作为代谢组学样品溶液。放置在 -20°C 冰箱中等待进样。

质控(QC)样本的制备:将所有的血清样本精密吸取20 μL ,涡旋2 min以充分混合,制备出包含所有血清样本的QC样本。余步骤均同血清样品的前处理。

2.2 色谱和质谱条件 色谱条件:液相色谱为UltiMate 3000超高效液相色谱仪,选择Hypersil GOLD aQ- C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm,1.9 μm);流动相0.05%甲酸水溶液(A)-0.05%甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱(2%B平衡3 min,0~1 min,2%B;1~3 min,2%~40%B;3~5 min,40%~98%B,2%B平衡10 min)。流速0.35 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量2 μL 。

质谱条件:采用正、负离子模式对样品进行检测。鞘气流速45 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,辅助气流速10 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,离子源温度 350°C ,分辨率7万,S-Lens RF Level为55,负离子裂解电压3 kV,正离子裂解电压3.5 kV。质谱采集范围 m/z 80~1 000。

2.3 模式识别与数据处理 利用ProteoWizard将原始数据转换成“mzXML”格式,然后用R语言软件包进行分析,删除峰强度为0的信息,完成峰识别、峰对齐及保留时间校正,最终获得由质荷比、峰强度和保留时间组成的三维数据矩阵。得到TSV格式的数据。将不同的数据数组设置为正常、高血压前期和高血压,以CSV格式保存为表格文件以供进一步分析。

2.4 代谢通路分析及网络构建 从软件中预测的化合物被映射到京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析网络中,得到相应通路;同时使用MetaboAnalyst 5.0软件平台的通路分析(pathway analysis)功能,对mzCloud, ChemSpider和Mass

Lists 鉴定所得的化合物进行代谢通路分析, 通路库选择 *Homo sapiens* (KEGG), 通路分析算法选择超几何分布检验, Relative-betweenness Centrality, 代谢组学参考选择 Use all compounds in the selected pathways. MetaboAnalyst 5.0 的通路分析功能以 KEGG 数据库作为背景知识库, 是专用于分析代谢组学的数据分析, 可以同时结合通路富集分析与通路拓扑分析的结果, 将代谢标志物的 HMDB ID 导入, 可以整合出这些代谢物中联系最密切的代谢途径。

运用 Cytoscape 软件中 MetScape 挖掘相关基因, 将代谢组学所获得的代谢物和相关基因导入 MetaboAnalyst 5.0, 构建 Compound-Reaction-Enzyme-Gene 网络 (C-R-E-G 网络) 和 Metabolite-Gene-Disease 网络 (M-G-D 网络), 得到 3 组人群间产生变化的总代谢网络及相关基因。对已鉴定的代谢物进行探索, 并得到代谢物与代谢物之间的热点节点和交互过程; 对所有代谢物之间的生物功能作进一步联系探索, 得到具有热点功能的节点代谢物。

2.5 验证实验

2.5.1 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 按 4:1 的比例, 将蛋白质溶液加入 5×蛋白质缓冲液中, 在沸水中变性 15 min, 并在 -20 °C 冰箱中保存。采用 SDS-PAGE 和 PVDF 膜分离和传递蛋白质样品。室温下, 用 5% 脱脂乳在脱色摇瓶上密封膜 1 h。

将一级抗体 [5% 脱脂乳用 TBST 溶解, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 用 TBST 溶解磷酸化蛋白] 稀释后, 在 4 °C 环境孵育过夜。用 TBST 在脱色摇瓶上室温洗涤 3 次, 每次 5 min, 二抗用 Tris-HCl 缓冲盐溶液稀释 3 000 倍。室温孵育 30 min 后, 在脱色摇瓶上用 TBST 在室温下洗涤 3 次, 每次 5 min, 然后用 ECL 溶液检测。用 Image J 1.8.0 软件进行灰度值分析。

2.5.2 ELISA 检测 用 ELISA 试剂盒检测正常组、高血压前期组和高血压组血清细胞因子 (IL-6, IL-10) 水平。用 Multiskan GO 1510 ELISA 阅读器在 450 nm 处读取吸光度。

2.6 人脐静脉内皮细胞 采用人脐静脉内皮细胞 (HUVECs, 美国 ScienCel 公司, 货号 ZQ0446), 在含有 5% 胎牛血清, 1% 内皮细胞生长补充剂和 1% 青霉素/链霉素溶液的内皮细胞培养基中培养。细胞培养于 5% CO₂ 加湿培养箱中, 培养温度 37 °C。每隔 1 d 更换 1 次液体, 当细胞在显微镜下融合到 80% 时, 进行传代培养。

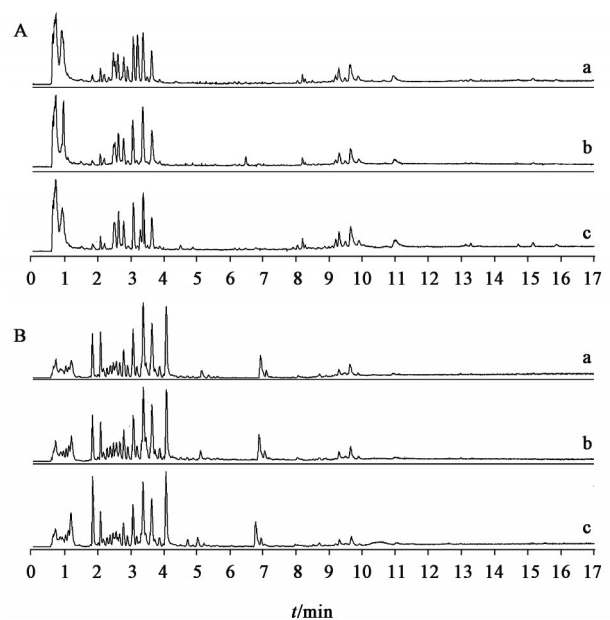
用 10 ng·L⁻¹ 肿瘤坏死因子 (TNF)- α 刺激人脐静脉内皮细胞, 测定 IL-6 和 IL-10 共计 6 h。非刺激培养上清作为空白。胆酸和脱氧胆酸 (6.25 μ m, 先前确定为最佳浓度^[10]) 用于干预 TNF- α 诱导的 HUVECs, 用 ELISA 试剂盒检测干预前后的炎症情况。

2.7 统计分析 采用 SPSS 21.0 进行统计分析。计数数据取百分数, 测量数据取 $\bar{x} \pm s$ 平均数标准差。各组间计数数据比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的阈值。测量数据组间比较, 按正态分布, 采用单因素方差分析对 3 组进行比较, 未进行比较的采用秩和检验。

3 结果

3.1 血清代谢组学观察潜在生物标志物及代谢途径情况

3.1.1 总离子流图的比较 在优化的色谱条件下, 对血清样品的总离子色谱进行正、负模式分析, 见图 1。结果表明在正常组、高血压前期组和高血压组中, 样品分离良好, 部分光谱峰的保留时间不同。



A. 负离子; B. 正离子; a. 正常组; b. 高血压前期组; c. 高血压组 (图 2 同)

图 1 不同组别患者血清样品的总离子色谱 (TIC)

Fig. 1 Total ion chromatography (TIC) of serum samples in positive and negative modes of different group patients

3.1.2 多元数据分析 在不同的人群中, 通过多元数据分析可以发现复杂 MS/MS 数据的细微变化。从原始数据中获取 CSV 格式的数据导入 SIMCA-p11.5; 然后在主成分分析 (PCA) 评分图中可以清楚

地观察到3组之间的分离,并可以发现明显的分类,进一步降维最小二乘判别分析(PLS-DA),见图2。这表明3组之间的代谢模式存在差异。PLS-DA模型在阳性模式下 R^2Y 和 Q^2 分别为0.894和0.807,在阴性模式下 R^2Y 和 Q^2 分别为0.825,0.739,说明PLS-DA模型对 Y 矩阵的解释和预测能力。

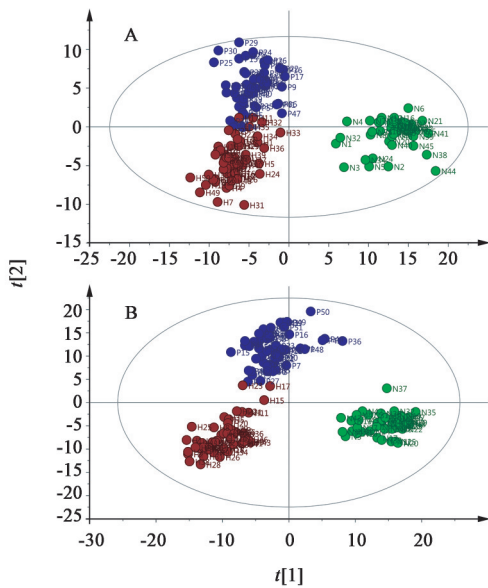


图2 偏最小二乘判别分析(PLS-DA)图显示高血压前期、高血压和健康组的血清数据

Fig. 2 Partial least-squares-discriminant analysis (PLS-DA) plot of serum data from the prehypertension, hypertension and healthy groups

3.1.3 代谢物鉴定和途径分析 根据MS/MS片段、保留时间和在线数据库确定潜在的生物标志物。

表2 不同患者血清代谢物 MetaboAnalyst 5.0 筛选的代谢途径

Table 2 Metabolic pathways filtered by MetaboAnalyst 5.0 of different group patients

通路	期望值	路径影响值	化合物的总数(匹配的生物标志物)/个
泛酸和辅酶A生物合成	0.563 87	0.021 43	19(3)
谷胱甘肽代谢	0.830 97	0.024 60	28(1)
初级胆汁酸生物合成	1.365 20	0.025 40	46(4)
乙醛酸和二羧酸代谢	0.949 68	0.055 56	32(2)
酪氨酸代谢	1.246 50	0.056 77	42(3)
色氨酸代谢	1.216 80	0.130 94	41(1)
柠檬酸循环(TCA循环)	0.593 55	0.140 41	20(2)
组氨酸代谢	0.474 84	0.221 31	16(1)
苯丙氨酸代谢	0.296 77	0.357 14	10(1)
β -丙氨酸代谢	0.623 23	0.399 25	21(2)
牛磺酸和低牛磺酸代谢	0.237 42	0.428 57	8(1)
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	0.118 71	0.500 00	27(3)
亚油酸	0.148 39	1	5(1)

用mzCloud质谱库对不同碎片离子的分子式、代谢物的准确相对分子质量, m/z 和MS/MS谱进行了匹配。阳性模式下35种代谢物和阴性模式下42种代谢物显示出显著的变化强度,其中13种代谢物同时出现在阳性和阴性模式下。

通过MetaboAnalyst 5.0软件的路径富集分析和拓扑分析,导入64种代谢物的HMDBID后,对所选代谢物进行代谢路径分析,绘制代谢路径汇总,见图3。图中的圆形标记表示与导入的代谢物匹配的代谢途径,颜色表示 P 值,大小表示影响值。筛选出影响值 >0.01 的途径作为重要代谢途径,确定了酪氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成、色氨酸代谢、苯丙氨酸代谢和亚油酸代谢等13条代谢途径,见表2。

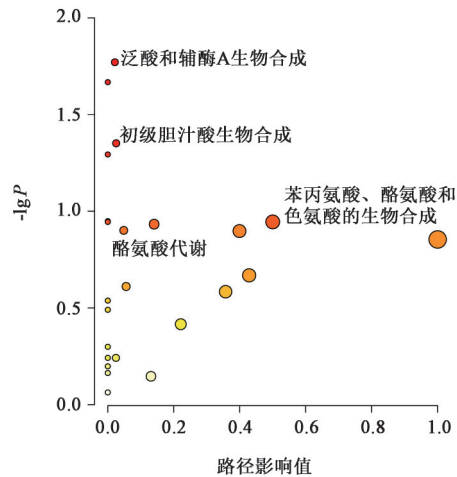


图3 不同患者血清代谢物 MetaboAnalyst 5.0 途径分析总结

Fig. 3 Summary of pathway analysis using tpathway analysis module of MetaboAnalyst 5.0 of different group patients

3.2 关键标志物及代谢通路 为可视化和解释代谢物、相关酶、基因、途径和相关疾病之间的关系和相互作用,构建了复合反应酶-基因网络(C-R-E-G网络),代谢物-基因-疾病相互作用网络(M-G-D网络)。靠近中心的节点反映了整体代谢水平更有效的改变,具有更多连接片段的节点显示出与其他靶点更大的相关性^[11]。

在C-R-E-G网络中,L-谷氨酸,L-苯丙氨酸,L-酪氨酸,L-异亮氨酸,L-丙氨酸,柠檬酸盐,4-香豆酸盐,甘胆酸盐,3 α -7 α -12 α -三羟基-5 β -胆酸盐,顺乌头酸盐和3 α -12 α -二羟基-5 β -胆酸盐位于整体网络的中心,并且与其他节点关联最密切,参与芳香族氨基酸代谢和胆汁分泌,可能在高血压的进展中起重要作用。

高亮M-G-D网络中的旁中心节点,通过KEGG数据库探索节点的生物学功能,发挥生物学功能的节点集中于酪氨酸代谢($P=0.000\ 001\ 27$),苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成($P=0.004\ 27$),牛磺酸和亚牛磺酸代谢($P=0.007\ 67$),初级胆汁酸生物合成($P=0.014\ 5$),苯丙氨酸代谢($P=0.01\ 45$),丝氨酸和蛋氨酸代谢($P=0.028\ 8$),黑素原生成($P=0.083\ 6$),细胞因子-细胞因子受体相互作用($P=0.199$)。髓过氧化物酶(MPO)是牛磺酸和他牛磺酸代谢和初级胆汁酸生物合成通路共有的节点,胆汁酸-辅酶A:氨基酸N-酰基转移酶(BAAT)参与胆汁酸-氨基酸缀合物的形成以及酪氨酸代谢。

3.3 体外实验验证相关信息

3.3.1 ELISA和Western blot分析验证BAAT,MPO和TGR5表达情况 基于代谢组学及网络构建,结合前人已发表的成果和代谢功能探索,挖掘到代谢物本身、网络中热点节点及代谢网络相关酶等多个与胆汁酸代谢、氨基酸代谢相关的重要靶点。代谢组学结果显示,高血压前期患者存在胆汁酸代谢和芳香族氨基酸代谢异常,提示胆汁酸代谢参与了高血压前期的病理过程。高血压前期已出现血管内皮损伤和炎症^[12],胆汁酸及其受体具有抗炎作用^[13]。因此,推测胆汁酸参与了高血压前期的血管炎症。

网络构建挖掘到胆汁酸代谢通路及苯丙氨酸代谢通路中的重要酶胆汁酸/BAAT,MPO在代谢网络变化中存在意义,故对上述靶点进行验证,同时,为了进一步探索胆汁酸代谢在高血压病痰瘀互结证进展过程中的变化,还对该代谢通路的重要下游胆汁酸受体TGR5进行了验证。TGR5被认为是胆

汁酸膜受体,但其也可以通过下调TNF- α 影响胆汁酸的生物合成^[14],有利于改善内皮细胞的炎症状态^[15-16]。经验证,高血压前期组TGR5水平表达低于健康组,但高于高血压组,3组间表达趋势与BAAT一致,见图4,表3。高血压前期组MPO表达低于高血压组,高于正常组。正常组、高血压前期组和高血压组血清中胆汁酸相关酶的表达降低,说明在高血压的发展过程中存在胆汁酸代谢和转化的丧失。这种损失可能导致牛磺酸或胆汁酸转化的其他有益血管物质减少,血管炎症不能得到改善,微血管炎症状态下出现血管痉挛和血管壁压力变化,从而导致高血压。

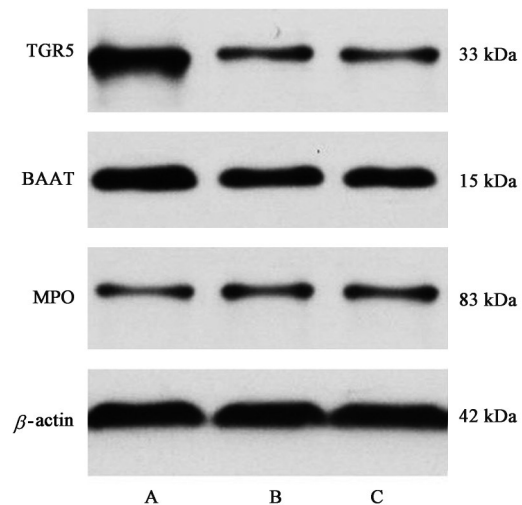


图4 TGR5,BAAT和MPO在正常组、高血压前期组和高血压组血清中的蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of TGR5, BAAT and MPO in normal group, prehypertension group and hypertension group

表3 各组患者血清中TGR5,BAAT和MPO的蛋白表达分析($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Protein expression analysis of TGR5, BAAT and MPO in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TGR5	BAAT	MPO
正常	47	1.05 \pm 0.17 ¹⁾	0.84 \pm 0.17 ¹⁾	0.09 \pm 0.01 ¹⁾
高血压前期	52	0.37 \pm 0.30 ²⁾	0.60 \pm 0.29 ²⁾	0.35 \pm 0.17 ²⁾
高血压	52	0.14 \pm 0.01 ³⁾	0.18 \pm 0.01 ³⁾	0.88 \pm 0.02 ³⁾

注:与高血压前期组比较¹⁾ $P<0.01$,与高血压组比较²⁾ $P<0.01$,与正常组比较³⁾ $P<0.01$ (表4同)。

目前,对高血压前期炎症指标的验证主要集中在NF- κ B信号通路^[17]、内皮素和一氧化氮水平^[18]。IL-6和IL-10作为重要的炎症因子,参与细胞的生长、分化、修复和免疫过程。IL-6是一种促炎症因子,参与炎症反应。IL-10可以通过阻断巨噬细胞的代谢来抑制炎症。因此,选择IL-6和IL-10作为高

血压进展过程中炎症状态的炎症指标,并应用于ELISA实验。高血压前期和高血压患者血清中IL-6的水平较高,而抗炎因子IL-10在高血压前期和高血压患者血清中的水平较低,见表4。在健康人、高血压前期患者和高血压患者血清中,高血压前期患者炎症反应的中位水平被认为是高血压进展的过渡趋势。

表4 ELISA检测培养血清中白细胞介素IL-6和IL-10含量($\bar{x}\pm s$)
Table 4 ELISA for detection of interleukin IL-6 and IL-10 in culture supernatant ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IL-6	IL-10
正常	47	35.76±5.79 ¹⁾	55.56±12.28 ¹⁾
高血压前期	52	90.31±6.69 ²⁾	45.43±7.16 ²⁾
高血压	52	125.56±7.55 ³⁾	30.06±15.24 ³⁾

3.3.2 体外细胞试验验证HUVECs中IL-6,IL-10的浓度情况 胆酸和脱氧胆酸显著降低TNF- α 诱导的人脐静脉内皮细胞中IL-6的水平,增加IL-10的水平诱导人脐静脉内皮细胞,见表5。这一结果证明,胆汁酸对HUVECS的炎症有影响,并能减轻内皮细胞的炎症反应。因此,高血压前期胆汁酸相关酶及其生物合成的不足可能参与了高血压血管炎症的发生。

表5 各组HUVECs中IL-6,IL-10的浓度($\bar{x}\pm s$)
Table 5 Concentration of IL-6, IL-10 in HUVECs in various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6	IL-10
空白	39.17±7.43	46.82±7.90
TNF- α 处理	271.17±8.83 ¹⁾	23.36±4.76 ¹⁾
胆酸处理	176.91±9.04 ²⁾	37.40±3.24 ²⁾
脱氧胆酸处理	191.96±5.76 ³⁾	34.09±4.75 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.001$;与TNF- α 处理组比较²⁾ $P<0.001$;与TNF- α 处理组比较³⁾ $P<0.05$ 。

4 讨论

高血压的发生和发展受多种因素的影响,引起血管收缩、损伤、重构和血压持续升高。与高血压相比,高血压前期的异常血压状态是早期的、可逆的,因此预防和控制高血压前期具有重要意义。

在上述研究中,笔者采用非靶向代谢组学方法,发现在正常组、高血压前期组和高血压组中有64个潜在的生物标志物。网络分析和生物学验证结果表明,高血压前期的发生与胆汁酸和芳香族氨基酸代谢异常引起的血管炎症有关。胆汁酸及其合成衍生物参与血管炎症反应、血管活性物质的调

节和能量代谢,与高血压的发病机制密切相关^[19-20]。本研究首次在高血压前期患者血清中检测到胆汁分泌紊乱,高血压前期患者胆汁酸代谢的改变可能与早期血管损伤有关,血管炎症和内皮损伤是高血压的重要病理机制,可加重高血压等并发症的进展。

代谢组学与网络分析相结合的方法通常应用于中药和网络药理学领域,但很少用于疾病的鉴别和诊断。在这项研究中,代谢组学和网络分析的结合有助于我们深入了解大量内源性靶点之间的功能和相互作用。在这些代谢变化中,MPO和芳香族氨基酸代谢的许多靶点被认为是有意义的。MPO是炎症反应过程中被激活的中性粒细胞和单核细胞释放到细胞外液中的一种酶,参与牛磺酸/亚牛磺酸代谢和初级胆汁酸生物合成^[21]。作为全身炎症的产物,MPO衍生的氧化剂在心血管疾病的炎症条件下成为组织损伤的关键因素^[22]。MPO在炎症部位的氧化应激和体内脂质过氧化的启动中起主要作用^[23]。Western blot结果显示,3组MPO的表达均依次增加,提示高血压前期患者存在MPO介导的氧化损伤,且随着病情的进展,MPO的表达逐渐增加。BAAT是胆汁酸代谢和苯丙氨酸代谢途径中的一种重要酶,介导胆汁酸的酰胺化^[24]。其缺乏可导致胆汁酸代谢和转化的丧失以及TGR5的降低,导致内皮细胞功能障碍和血管损伤^[25]。BAAT和TGR5的Western blot结果显示,正常组、高血压前期组和高血压组的表达依次下降,与3组IL-6水平相反,说明高血压前期组胆汁酸代谢不足导致炎症损伤后修复不足。

TGR5在肝窦内皮细胞中高表达,激活TGR5也能刺激内皮细胞NO合酶mRNA的表达,提高NO水平,从而抑制黏附分子的产生。TGR5的激活可以抑制促炎细胞因子的产生,减轻血管损伤的进一步发展^[26]。此外,TGR5介导的胆汁酸信号通路可以调节能量稳态,TGR5被认为是增加能量消耗和减肥的重要靶点^[27-28]。本研究表明,正常组、高血压前期组和高血压组之间胆酸、脱氧胆酸、甘胆酸等胆汁酸代谢指标存在显著性差异。Western blot结果显示,高血压前期组和高血压组TGR5的表达均低于正常组,提示血压异常者可能存在胆汁酸代谢异常,缺乏修复炎症损伤的能力。因此推测胆汁酸代谢可能通过调节血管炎症反应在高血压前期和高血压的发生发展中起重要作用。

胆汁酸代谢在高血压前期到高血压的过程中

起着重要作用,而代谢组学的研究和网络分析展示了复杂生物信息中关键的节点。通过以上节点的网络分析和验证,进一步探讨高血压前期与胆汁酸相关代谢物的关系,结合胆汁酸、肠道菌群、高血压前期代谢等方面的研究,为进一步防治高血压提供科学的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] XU T, LIU J, ZHU G, et al. Prevalence of prehypertension and associated risk factors among Chinese adults from a large-scale multi-ethnic population survey [J]. BMC Public Health, 2016, 16 (1):775.
- [2] CHOBANIAN A V, BAKRIS G L, BLACK H R, et al. The seventh report of the Joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report [J]. JAMA, 2003, 289(19):2560-2572.
- [3] EGAN B M, STEVENS-FABRY S. Prehypertension-prevalence, health risks, and management strategies [J]. Nat Rev Cardiol, 2015, 12:289-300.
- [4] HUANG Y, WANG S, CAI X Y, et al. Prehypertension and incidence of cardiovascular disease: a Meta-analysis [J]. BMC Med, 2013, 11:177.
- [5] GE Q, YUAN W, ZHOU J Y, et al. Correlation between arterial stiffness and left ventricular diastolic function in prehypertension [J]. J Jiangsu University (Medicine version), 2015, 25:326-330.
- [6] ANDRADE J, KHAIRY P, DOBREV D, et al. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms [J]. Circ Res, 2014, 114(9):1453-1468.
- [7] WANG H J, WANG X M, QI D M, et al. Establishment of the circadian metabolic phenotype strategy in spontaneously hypertensive rats: a dynamic metabolomics study [J]. J Transl Med, 2020, 18:38.
- [8] YANG W, DENG Y, ZHOU H, et al. Metabolic characteristics of *Rhizoma Coptidis* intervention in spontaneously hypertensive rats: insights gained from metabolomics analysis of serum [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4):4301-4308.
- [9] XU J W, LI Y L, ZHANG S J, et al. Quantitative serum proteomic analysis of essential hypertension using iTRAQ technique [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 6761549.
- [10] KUNDU S, BANSAL S, MUTHUKUMARASAMY K M, et al. Deciphering the role of hydrophobic and hydrophilic bile acids in angiogenesis using in vitro and in vivo model systems [J]. Med Chem Comm, 2017, 8(12):2248-2257
- [11] WU F, ZHENG H, YANG Z T, et al. Urinary metabolomics study of the hepatoprotective effects of total alkaloids from *Corydalis saxicola* Bunting on carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity in rats using ¹H NMR analysis [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2017, 140:199-209.
- [12] LOU G, MA X, FU X, et al. GPBAR1/TGR5 mediates bile acid-induced cytokine expression in murine Kupffer cells [J]. PLoS One, 2014, 9(4):e93567.
- [13] KEITEL V, REINEHR R, GATSIOS P, et al. The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells [J]. Hepatology, 2007, 45(3):695-704.
- [14] WANG X X, WANG D, LUO Y, et al. FXR/TGR5 dual agonist prevents progression of nephropathy in diabetes and obesity [J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29 (1):118-137.
- [15] JELLINGER K A. The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease [J]. Drugs Aging, 1999, 14 (2) : 115-140.
- [16] BANEGAS I, PRIETO I, SEGARRA A B, et al. Blood pressure increased dramatically in hypertensive rats after left hemisphere lesions with 6-hydroxydopamine [J]. Neurosci Lett, 2011, 500(2):148-150.
- [17] 陈纪焯, 周国锋, 王永成, 等. 桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍通过调节 TGF- β_1 /Smads 信号通路及慢性炎症改善盐敏感高血压大鼠心肌纤维化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1):50-58.
- [18] ALBARWANI S, AL-SIYABI S, TANIRA M O. Prehypertension: underlying pathology and therapeutic Options [J]. World J Cardiol, 2014, 6:728-743.
- [19] MIYAZAKI-ANZAI S, MASUDA M, KOHNO S, et al. Simultaneous inhibition of FXR and TGR5 exacerbates atherosclerotic formation [J]. J Lipid Res, 2018, 59(9):1709-1713.
- [20] KIDA T, OMORI K, HORI M. Stimulation of G protein-coupled bile acid receptor enhances vascular endothelial barrier function via activation of protein kinase A and Rac1 [J]. J Pharmacol Experiment Therapeut, 2014, 348:125-130.
- [21] KHALILOVA I S, DICKERHOF N, MOCATTA T J, et al. A myeloperoxidase precursor, pro-myeloperoxidase, is present in human plasma and

- elevated in cardiovascular disease patients [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3):e0192952.
- [22] GETEHELL J P, WROBLEWSKI K E, DEMARIA A, et al. Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians [J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2013, 62:362-365.
- [23] ZHANG R, BRENNAN M L, SHEN Z, et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48):46116-46122.
- [24] HADŽIĆ N, BULL L N, CLAYTON P T, et al. Diagnosis in bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase deficiency [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(25):3322-3326.
- [25] QIN P, TANG X, ELLOSO M M, et al. Bile acids induce adhesion molecule expression in endothelial cells through activation of reactive oxygen species, NF-kappaB, and p38 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(2):H741-747.
- [26] STEPANOV V, STANKOV K, MIKOV M. The bile acid membrane receptor TGR5: a novel pharmacological target in metabolic, inflammatory and neoplastic disorders [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2013, 33(4):213-223.
- [27] HAGEMAN J, HERREMA H, GROEN A K, et al. A role of the bile salt receptor FXR in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(8):1519-1528.
- [28] WATANABE M, HOUTEN S M, MATAKI C, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation [J]. *Nature*, 2006, 439(7075):484-489.

[责任编辑 顾雪竹]

·书讯·

采用窝沟封闭术配合3 M适乐氟保护漆预防小儿龋齿的远期效果 ——《儿童口腔健康管理手册》

龋齿属于一种细菌性口腔疾病,发病群体主要是儿童。龋齿会造成患儿牙齿硬组织受到严重损伤,进而导致牙髓炎或根尖周炎出现,发病原因主要是口腔内变形链球菌感染、牙齿发育不良及口腔环境差等。儿童生长发育期有喜吃零食易引起龋齿。临床中预防龋齿的常用方法就是窝沟封闭术,是将封闭材料涂抹于患者牙齿窝沟处,从而达到隔离外界物质的作用。适乐氟是有效保护窝沟封闭剂脱落。

《儿童口腔健康管理手册》主编王洁雪,黄睿洁。四川大学出版社2019年11月出版。该书中介绍了窝沟封闭术配合3 M适乐氟保护漆治疗小儿龋齿远期效果良好。王洁雪主编是华西口腔医院儿童口腔科医师,担任儿童口腔医师培训任务。查阅了大量的文献,认真撰写,完成了这本有助于家长进行孩子口腔健康管理的手册。黄睿洁主编是中华口腔医学会会员,中华口腔医学会儿童口腔医学专委会会员,参加编写了《儿童口腔科诊疗规范》《实用口腔微生物学图谱》《口腔微生物学实验指导》等书籍。《儿童口腔健康管理手册》分为两个部分,第一部分为“做合格父母,孕育优质生命”,介绍母亲从孩子出生到青春期,从乳牙的形成到乳恒牙替换的各阶段家长们应如何正确引导孩子的口腔健康。第二部分为“延伸阅读”,龋齿病和牙周病的防治,个性化的口腔卫生保健,高危人群的口腔综合保健,牙体牙髓疾病的治疗。全书内容涵盖了口腔健康管理需要注意的要点,针对大家关心的口腔问题,如介绍了儿童乳牙龋齿,第一次看牙医,儿童龋齿风险评估,错颌畸形,牙齿外伤的应急处理等。在书中主要介绍了窝沟封闭术配合3 M适乐氟保护漆治疗小儿龋齿远期效果分析,治疗过程中,窝沟封闭,术前彻底清洗窝沟及牙面,用水枪冲洗口腔残留的清洁剂,风干后用气枪将牙面展开,保证牙面保持干燥清洁。用酸蚀液对窝沟及牙面进行酸蚀处理,时间控制在30~35 s,用无油三枪冲洗残余酸蚀液,加压冲洗时间为20~25 s,确保窝沟及牙面的完全去除玷污层;选用光固化封闭剂进行封闭,取适量封闭剂涂抹在干燥的牙面上,并在沟槽内喷出气泡后进行打光作业,封闭剂固化完成后,用探针检查固化程度和黏结情况,清除多余的封闭剂,检查有无气泡存在,寻找有无遗漏或未封闭的窝沟,观察封闭材料是否过高而影响咬合。手术后取适量3 M适乐氟保护漆(0.50 mL/粒)涂于牙齿表面,做好注意事项的宣传,叮嘱家属30~35 min不得进食进水。第四次全国口腔流行病学调查结果表明,在多种因素共同作用下,12岁儿童恒牙龋齿患病率呈上升趋势。乳磨牙在儿童生长发育中起着重要的作用,如果乳磨牙出现龋齿,不仅会影响咀嚼功能,还会影响牙颌面系统的正常发育。窝沟封闭是一种无痛无创伤的方法,不损害牙齿组织,属典型的龋齿预防技术。经研究证实,实际治疗过程中,患者疼痛轻,呕吐、过敏等症状较少,更适合儿童龋齿预防。使用时所使用的窝沟封闭剂为合成树脂材料,具有表面光滑,固化深度大等优点,封闭容易患龋齿的点隙裂沟,用有黏结性的口腔修复材料充填窝洞,在牙齿表面涂抹一层氟化物,24 h左右的时间内,氟离子会缓慢地释放出来,在抗菌的同时提高牙釉质抗酸能力。

《儿童口腔健康管理手册》阐述了儿童口腔健康管理需要注意的要点,针对口腔几大关心的核心问题,尤其适合临床口腔工作的医护人员参考,有利于指导解决在口腔工作中遇到的实际问题。对于广大家长而言,具有极强的可读性和指导性。

(作者金费妍¹,杨琴²,1.浙江省桐乡市妇幼保健院,浙江桐乡 314500; 2.嘉兴市秀洲区洪合镇卫生院,浙江嘉兴 314023)